日本三株斜纹夜蛾核型多角体病毒的增殖特性及其多角体蛋白基因的序列分析

朱　江[1]，沈颂东[1]，王文兵[2]，朱玉芳[1]，池田素子[3]，胡兆丽[1]，盛　晔[1]

（1. 苏州大学生命科学学院，江苏苏州　215006；2. 江苏大学生命科学学院，江苏镇江　212013；
3. 日本名古屋大学大学院生命农学研究科，日本名古屋　464-8601）

摘要：利用斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 培养细胞，对近年来在日本本州、九州和四国等地发现并筛选出的对斜纹夜蛾幼虫具有强烈杀虫活性的 3 株斜纹夜蛾核型多角体病毒（SpltMNPV）（K-3、G1-2 和 G10-3）进行了生物学活性和分子生物学的初步研究，克隆了多角体蛋白基因，并进行了序列分析和比较。结果表明：（1）SpltMNPV 日本分离株 K-3、G1-2 和 G10-3 分别具有不同的特征性酶切图谱，分别属于 3 种基因型（A 型、B 型和 C 型）；（2）3 个分离株的芽生型病毒（budded virus）产生能力和多角体产生能力有差异，免疫印迹分析表明，多角体蛋白的分子量也不同；（3）日本株 SpltMNPV 核型多角体蛋白结构基因由 747 个核苷酸编码序列（编码 249 个氨基酸）组成，其序列与中国株 SpltMNPV 的同源性为 98.9%，与其他 6 种核型多角体病毒有较高的同源性（61.7% ~ 74.2%），但其 5′端侧翼序列（nt-1 ~ -100）与 AcMNPV 和 BmNPV 相比差异显著，在对该基因表达调控起决定性作用的 8 个高度保守核苷酸序列中（nt-44 ~ -51）有 2 处发生自然突变。

关键词：斜纹夜蛾；核型多角体病毒；多角体蛋白基因；序列分析

中图分类号：Q766　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2004)05-0543-08

Proliferation characteristics of three Japanese strains of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus in cultural cells and sequence analysis of their polyhedrin genes

ZHU Jiang[1]，SHEN Song-Dong[1]，WANG Wen-Bing[2]，ZHU Yu-Fang[1]，IKEDA Motoko[3]，HU Zhao-Li[1]，SHENG Ye[1]（1. School of Life Sciences，Suzhou University，Suzhou，Jiangsu 215006，China；2. Institute of Life Sciences，Jiangsu University，Zhenjiang，Jiangsu 212013，China；3. Graduate School of Bioagricultural Sciences，Nagoya University，Nagoya　464-8601，Japan）

Abstract：Biological and molecular characteristics of three strains（K-3，G1-2 and G10-3）of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus（SpltMNPV），isolated from Honshu，Kyushu and Shikoku，Japan，which had strong pesticide activity to *S. litura*，were primarily studied using the cultured cell strain of *S. litura*. The polyhedrin genes of the three strains was cloned and sequenced. The results showed that：（1）the three Japanese strains K-3，G1-2 and G10-3 had different restriction fragmentation patterns and belonged to the nucleic acid type A，B and C of SpltMNPV respectively.（2）There are differences in the outputs of budded virus（BV）and polyhedron between the three strains. According to the analysis of immunological blotting，the molecular weights of polyhedrin in the three strains were different.（3）The polyhedrin gene of the Japanese SpltMNPV is composed of 747 nucleic acids，which codes a peptide of 249 amino acids. The nucleic acid sequences homology is as high as 98.9% compared with the Chinese strain，and 61.7% – 74.2% with other six NPVs compared. However，in the 5′ upstream sequence（nt-1 – -100），SpltMNPV differs significantly with AcMNPV and BmNPV. There are 2 point mutations in the sequence with 8 highly conservative nucleic acids（nt-44 – -51），which is the domain of the promoter. Interestingly，in spite of only one mutation occurred in the polyhedron open reading frame of SpltMNPV C type，the western-blot result showed that the molecular weight of polyhedron of SpltMNPV C type is apparently different from that of A type and B type.

Key words：*Spodoptera litura*；nucleopolyhedrovirus；polyhedrin gene；sequence

---

基金项目：苏州大学“211 工程”基金项目（XB114060）

作者简介：朱江，男，1945 年生，苏州市人，教授，从事昆虫生物化学与分子生物学研究，E-mail：zhujiang@suda.edu.cn

收稿日期 Received：2004-02-11；接受日期 Accepted：2004-06-07

斜纹夜蛾核型多角体病毒（*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus，SpltMNPV）属于杆状病毒科，其宿主昆虫斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 是一种杂食性的重要农业害虫，在中国、日本、朝鲜和东南亚地区广泛地危害水稻、玉米、棉花、烟草、花生等数十种粮食和经济作物以及蔬菜等（Gabriel，1997；Murata *et al*.，1998）。

应用 SpltMNPV 防治斜纹夜蛾是一种有效的生物防治方法，特别是在各种化学合成杀虫剂严重污染环境以及害虫对杀虫剂抗性日益增强的情况下，生物防治愈显重要和迫切（Moscardi，1999）。尽管 SpltMNPV 作为商品化杀虫剂已在我国一些地方推广使用，但是，杀虫时间较长，宿主域窄以及对老龄幼虫的低毒性等缺点有待解决。寻找和筛选新的高毒力的病毒杀虫剂，并从细胞和分子水平研究病毒的生物学特性、基因的结构和功能，进一步通过遗传工程的途径改良病毒杀虫剂的杀虫效果是昆虫病毒学研究的重要内容（吕鸿声，1998）。

SpltMNPV 中国株的基因组全序列已被测定（Pang *et al*.，2001），目前已对该病毒基因组的部分基因作了序列分析，包括 *egt*、*p*10、*polh* 和 *gp*37 等基因（闫庆生等，1998；Wei *et al*.，1998；魏永杰等，1999；李充璧等，2001）。关于 SpltMNPV 日本株的基因克隆及序列分析研究在国内外尚未见报道，为此，我们利用斜纹夜蛾培养细胞，对近年来在日本本州、九州和四国等地发现并筛选出的对斜纹夜蛾幼虫具有强烈杀虫活性的 SpltMNPV 分离株进行了生物学活性和分子生物学的初步研究；克隆了 SpltMNPV 日本株三种基因型的 *polh*（多角体蛋白）基因，并进行了序列分析，为进一步研究病毒基因组的变异与生物学特性的关系、SpltMNPV 的侵染机制以及通过基因工程途径构建新的高效杀虫病毒奠定基础。

1　材料和方法

1.1　病毒和细胞

3 株 SpltMNPV 由日本岐阜县生物产业技术研究所 Katsumi Kamiya 博士馈赠。斜纹夜蛾 TUAT-Spli221 细胞由日本名古屋大学资源昆虫研究室 Michihiro Kobayashi 教授提供，苏州大学生命科学学院细胞与分子生物学教研室保存。Spli 细胞用 TC-100 培养基（添加 10% 胎牛血清，Invitrogen 公司）28℃下培养。

1.2　病毒感染

除空斑分析外，所有实验均使用 12.5 cm^2（Falcon 公司）或 25 cm^2（Corning 公司）培养瓶培养的单层贴壁细胞。12.5 cm^2 和 25 cm^2 的培养瓶内分别种入 1×10^6 和 2×10^6 个细胞，室温下静置 1～2 h，形成单层贴壁培养细胞。除去培养液后，12.5 cm^2 和 25 cm^2 培养瓶内分别接种 500 μL 和 1 000 μL 病毒液，感染复数（multiplicity of infection）为 1。室温下用震荡器慢摇 1 h，使病毒吸着细胞，然后除去病毒接种液，用 1 mL 培养液洗涤 2 次，分别加入 2.5 mL 或 5 mL 培养液，28℃培养。以病毒吸着细胞终了时为感染 0 h。

1.3　病毒 DNA 的提取、酶解及琼脂糖凝胶电泳

参照 Wu 等（2000）方法从感染的培养细胞提取病毒 DNA。溶于 TE（pH 8.0）的 SpltMNPV DNA 经浓度测定后，4℃保存备用。病毒 DNA 浓度由 A260nm 推算。

病毒 DNA 的限制酶酶解方法：1～2 μg 病毒 DNA 在含 1～2 μL 各种限制酶的 20～30 μL 反应液中，37℃酶解 5 h；酶解片段用 0.75% 琼脂糖凝胶（SeaPlaque GTG，FMC）电泳分离，EtBr 染色，凝胶成像系统（Gene 公司）分析、成像。各 DNA 片段大小通过 DNA Marker λDNA/*Hin*dⅢ和 λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ（TaKaRa）作标准进行推算。酶解片段数和片段大小，通过各种浓度琼脂糖凝胶电泳分析后进行综合估算。

1.4　芽生病毒定量样品和免疫印迹分析样品的制备

用 12.5 cm^2 培养瓶培养细胞，病毒感染后 0、24、48、72 和 96 h，分别用硅胶刮子刮取细胞，取 1.5 mL 细胞悬浊液至 1.5 mL 离心管内，3 000 r/min 4℃离心 5 min，上清液 −80℃保存，用于 BV（budded virus，芽生型病毒）定量。沉淀内加入 60 μL SDS-PAGE 样品缓冲液溶解，然后沸水浴处理 3 min，−20℃保存，作为免疫印迹分析样品备用。

1.5　芽生病毒定量（空斑分析法）

空斑分析根据 Shirata 等（1999）的方法进行。具体过程如下：将 1×10^6 个 Spli 细胞种于直径 35 mm 的培养皿内（Falcon），静置 1～2 h 使细胞贴壁，除去细胞培养液后，每个培养皿接种 200 μL 各种稀释度的病毒液，室温放置 1 h，使病毒吸着细胞。除去缓冲液后，覆盖含 0.75%（W/V）琼脂糖（SeaPlaque GTG，FMC）的 TC-100 3 mL，琼脂糖凝固后，用 parafilm 封口，28℃培养，直至空斑明显形成（约 5～7 天）。高压灭菌后 47℃保温的 3.75%（W/V）琼脂糖

水溶液与同 47℃保温的 TC-100 培养液以 1:4 比例混合（终浓度 0.75%）即覆盖用琼脂糖。

1.6 免疫印迹分析

多角体蛋白的免疫印迹分析根据 Shirata 等(1999)的方法进行。采用的一抗为 BmNPV 多角体蛋白兔抗血清（Michihiro Kobayashi 教授馈赠）。

1.7 质粒和菌株

载体质粒 pMD 18-T Vector（TaKaRa 公司），受体菌 JM109 由本实验室保存。

1.8 SpltMNPV 多角体基因的克隆

以 SpltMNPV 中国株（G2）基因组全序列 *polh* 基因读码框 5′及 3′端非编码序列设计一对引物（上游引物 5′-gacatgtaatgattagata-3′，下游引物 5′-tgtctcggttgtcctctt-3′）。以 3 种基因结构型日本株 SpltMNPV 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增条件为：94℃ 5 min，0℃ 5 min，然后进入循环反应，94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 2 min，30 次循环后 72℃ 10 min。片段的分离、连接、转化、重组质粒的鉴定等均按 Sambrook 和 Russell(2001)方法进行。

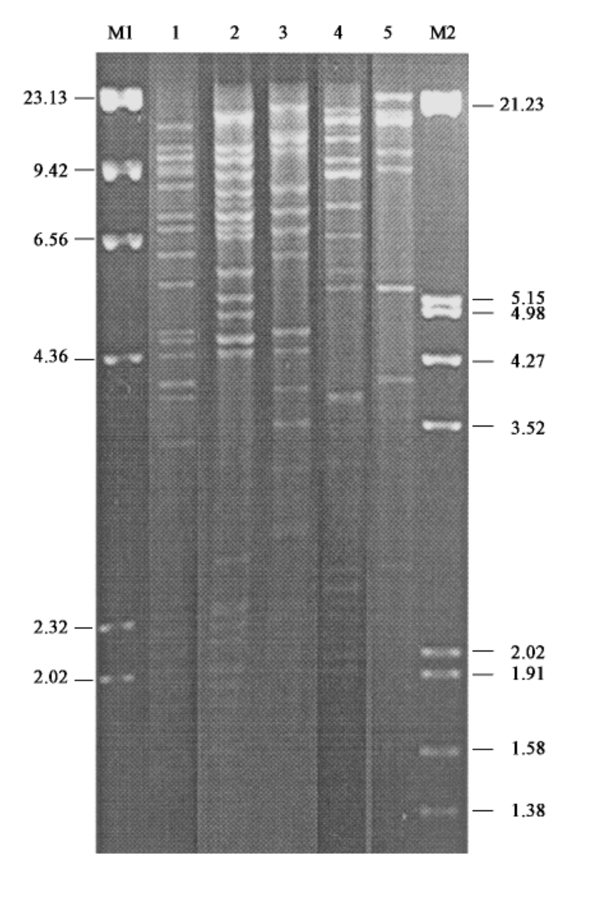


图 1 AcMNPV、BmNPV 和日本 3 株 SpltMNPV 基因组 DNA 的 *Eco*RⅠ酶切分析

Fig. 1 *Eco*RⅠ restriction digest patterns of AcMNPV, BmNPV and three Japanese strains of SpltMNPV

M1. λDNA/*Hin*dⅢ; 1. AcMNPV; 2. BmNPV; 3. K-3; 4. G1-2; 5. G10-3; M2. λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ.

1.9 序列测定和分析

序列测定应用 Bigdye-Terminator 3700 测序仪。对测得的序列用 DNASIS、PROSIS 等软件进行 ORF 及氨基酸序列分析，用 BLAST 软件搜索 GenBank 库中的同源基因，用 Clustal X 软件进行多序联配比较及同源性百分数计算。

2 结果

2.1 SpltMNPV DNA 的 *Eco*RⅠ酶切图谱分析

3 株 SpltMNPV DNA 的 *Eco*RⅠ酶切图谱分析表明，K-3、G1-2 和 G10-3 分别具有不同的特征性酶切图谱（图 1）。K-3、G1-2 和 G10-3 酶解后分别获得 26、22 和 19 个 DNA 片段，分别属于 A、B 和 C 型 3 种基因型（表 1）。

表 1 日本 3 株 SpltMNPV 基因的 *Eco*RⅠ酶解片段

Table 1 *Eco*RⅠ restriction fragments of three Japanese strains of SpltMNPV

K-3		G1-2		G10-3	
片段大小 Fragment size (kb)	片段代码 Fragment code	片段大小 Fragment size (kb)	片段代码 Fragment code	片段大小 Fragment size (kb)	片段代码 Fragment code
15.4	A	19.3	A	20.4	A
11.8	B	12.9	B	17.9	B
10.6	C	11.5	C	16.3	C
9.8	D	9.7	D	12.5	D
9.4	E	8.6	E	10.3	E
8.6	F	7.6	F	8.6	F
7.9	G	7.2	G	7.0	G
6.3	H	6.9	H	4.7	H
5.5	I	5.9	I	4.4	I
5.4	J	5.3	J	4.0	J
5.3	K	5.0	K	3.6	K
4.7	L	4.7	L	3.2	L
4.6	M	4.5	M	2.7	M
4.5	N	2.6	N	2.3	N
4.4	O	2.5	O	2.1	O
4.0	P	2.4	P	1.9	P
3.4	Q	2.3	Q	1.5	Q
2.2	R	2.2	R	1.3	R
2.0	S	2.0	S	1.2	S
1.8	T	1.9	T		
1.7	U	1.8	U		
1.6	V	1.1	V		
1.4	W				
1.3	X				
1.1	Y				
1.0	Z				
合计 Total					
135.4		127.9		125.9	

2.2 SpltMNPV 在 Spli 细胞内的增殖特性

研究表明，感染 SpltMNPV 的 Spli 细胞在感染24 h后，可以观察到细胞病变，A 型的 K-3 和 B 型的 G1-2 在感染 24 h 后已能见到少量多角体；C 型的 G10-3 在感染后 36 h 也能发现少量多角体，随着感染时间的延长，含多角体细胞的比例和每个细胞中多角体的数量也急剧增加。感染后 96 h，K-3 与 G10-3 含多角体的比例以及每个细胞内多角体的数量均比G1-2 明显地多。感染后 96 h 的细胞悬浮状况以 G10-3 的比例最高（约 90%），K-3 次之（约 50%），G1-2 最少（5%～10%）（图 2）。感染细胞释放到培养液内的 BV 数量，三种类型的病毒都随时间的推移而急速增加，感染后 48 h A 型的 K-3 已达最高值，B 型的 G1-2 和 C 型的 G10-3 接近最高值，感染后 72 h，B 型的 G1-2 和 C 型的 G10-3 略有增加，A 型的 K-3 基本维持稳定。从总体看，A 型和 B 型的 BV 产量比 C 型多（图 3）。

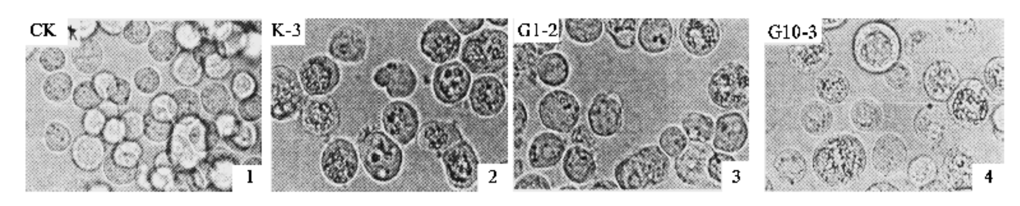


图 2 日本 3 株 SpltMNPV 感染斜纹夜蛾 Spli 细胞的多角体形成

Fig. 2 Polyhedral formation in the Spli cell lines infected with three strains of SpltMNPV from Japan for 48 h

1. 对照 Control; 2. K-3; 3. G1-2; 4. G10-3.

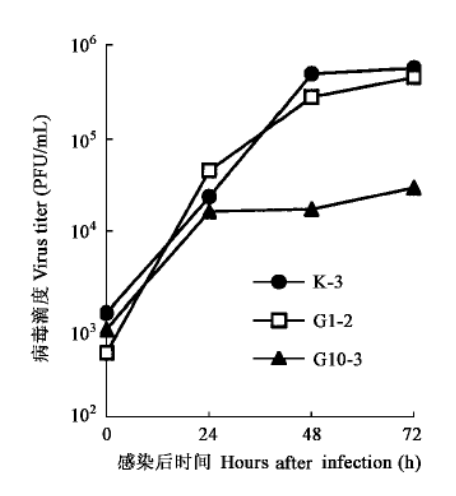


图 3 SpltMNPV K-3，G1-2 和 G10-3 感染斜纹夜蛾 Spli 细胞的芽生病毒生长曲线

Fig. 3 Budded virus growth curve of SpltMNPV K-3, G1-2 and G10-3 in Spli cells

每个点的数据为 3 个重复的平均值 Each point represents the mean value from three independent measurements.

2.3 多角体蛋白的免疫印迹反应

在病毒感染后 24 h，3 种基因型的 SpltMNPV 都可从免疫印迹图谱中见到明显的多角体蛋白区带。图谱显示，随着感染时间的推移，多角体蛋白均明显增加，以 24～48 h 增加最显著。分子量估算表明，A 型和 B 型的多角体蛋白约 29 kD，C 型的多角体蛋白仅 26.5 kD（图 4）。

2.4 SpltMNPV *polh* 基因的克隆和核苷酸序列特征

以 3 种基因型 SpltMNPV 基因组 DNA 为模板，用设计的一对引物进行 PCR 扩增，得到 3 个分子量约 900 bp 的产物，克隆到载体质粒 pMD 18-T Vector 内。进一步的 PCR 扩增和酶切鉴定证明克隆成功（GenBank 登录号 A 型：AY552474；B 型：AY549963；C 型：AY549964）。序列分析表明，3 个克隆包括了 3 种基因型 SpltMNPV *polh* 基因 ORF 的全部序列以及 5′和 3′端非编码区的部分序列。3 个克隆片段的核苷酸序列及其所推导的氨基酸全序列见图 5。这 3 个克隆片段包含了 747 bp 的读码框及 5′端启动子区 138 bp 和 3′端终止子区 26 bp 的序列。推导的读码框编码 249 个氨基酸，分子量约 29 kD，其中 C 型有一个氨基酸的改变。在起始密码子 ATG 上游 -20～-70 bp相对保守，其 A + T 含量达 76%。在 -51 bp处有一个杆状病毒启动子基序 TAAG，这是一个典型的杆状病毒晚晚期基因的启动子特征性序列。

2.5 同源性搜索与比较

同源性比较分析表明：SpltMNPV 日本株 A、B 和 C 型 *polh* 基因编码区核苷酸序列与中国株间的同源性分别为 98.5%、100% 和 99.9%，与甜菜夜蛾核型多角体病毒（SeMNPV）、舞毒蛾核型多角体病毒（LdMNPV）、苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（AcMNPV）、黄杉毒蛾核型多角体病毒（OpMNPV）、美国白蛾核型多角体病毒（HcNPV）和家蚕核型多角体病毒（BmNPV）的同源性分别为 74.2%、69.2%、69.1%、69.0%、68.8% 和 61.7%（表 2）。起始密码子 ATG 上游 -1～-100 的同源性比较分析表明：

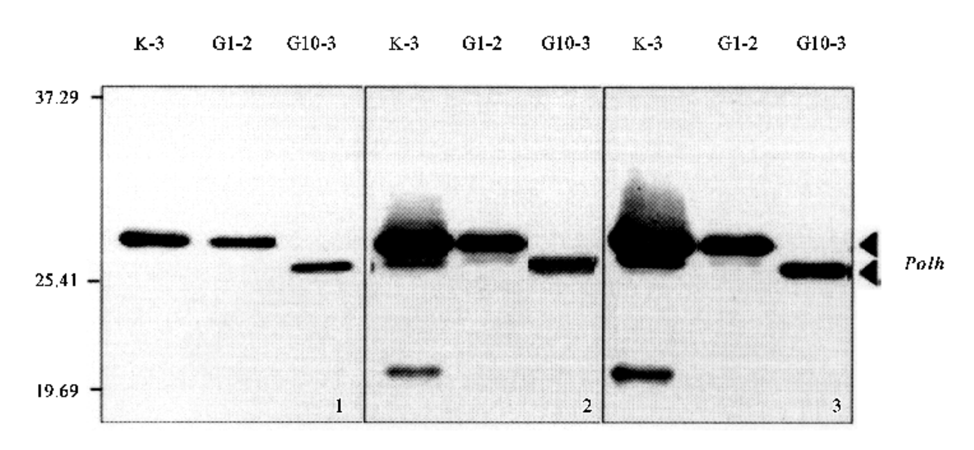


图4　SpltMNPV K-3，G1-2 和 G10-3 感染的斜纹夜蛾 Spli 细胞中多角体蛋白的免疫印迹分析

Fig. 4　Immunoblotting analysis of polyhedrin production in Spli cells infected with SpltMNPV K-3, G1-2 and G10-3

1. 感染后 24 h（24 h after infection）；2. 感染后 48 h（48 h after infection）；3. 感染后 72 h（72 h after infection）.

3种基因型日本株之间无差异，它们与中国株间的同源性为98.9%，与AcMNPV和BmNPV间的同源性分别为23.4%和11.0%，而AcMNPV与BmNPV间的同源性为85.0%。

氨基酸序列的同源性比较分析表明：SpltMNPV日本株A、B型多角体蛋白的氨基酸序列与中国株的完全相同，C型与中国株的同源性为99.6%，3种基因型SpltMNPV多角体蛋白的氨基酸序列与AcMNPV、HcNPV、SeMNPV、OpMNPV、LdMNPV和BmNPV的氨基酸序列分别有83.4%、82.9%、82.4%、82.4%、79.9%和77.9%的同源性（表2）。

3　讨论

本研究所用SpltMNPV是从日本各地斜纹夜蛾感病幼虫分离并经空斑纯化克隆的3个分离株。基因组DNA的*Eco*RⅠ酶切琼脂糖电泳可得到3种不同的图谱（图1，表1），这3种图谱与BmNPV和AcMNPV的*Eco*RⅠ酶切图谱（Maeda and Majima, 1990; Lavina *et al*., 2001a）有明显区别，而与从中国、菲律宾等地分离的SpltMNPV的*Eco*RⅠ酶切图谱（Lavina *et al*., 2001b）相似。因此推定日本这3种基因型SpltMNPV为不同的分离株。

Hara等（1995a, 1995b）比较了从日本和泰国分离到的甜菜夜蛾核型多角体病毒（SeNPV）对Se301细胞的感染和增殖情况以及对甜菜夜蛾的感病性，发现芽生病毒在培养细胞中的产量和多角体形成数量以及对幼虫的致死率均随分离株而异。Caballero等（1992）比较了美国和泰国的分离株（SeNPV-Us和Th）以及西班牙的2个分离株（SeNPV-Sp1和Sp2）的致病性，发现SeNPV-Th最高，SeNPV-Sp1最低。这些研究表明，自然界存在着致病性和增殖能力等生物学特性不同的SeNPV分离株。本研究对已克隆的SpltMNPV日本株3个分离株（A型的K-3、B型的G1-2和C型的G10-3）的生物学特性进行了较详细的比较分析。分析表明，A型和B型分离株的芽生病毒产量比C型分离株多，而产生多角体的细胞比例和每个细胞内多角体的数量则C型最多，A型次之，B型最少（图2、3）。B型芽生病毒多，但多角体少，所以细胞凋亡晚，而A型和C型多角体多，细胞死亡就快。3个分离株的芽生病毒产生能力和多角体产生能力的差异很可能与病毒感染早早期表达的早期基因产物的活性差异有关，但是，这种活化能力的差异是由早期基因产物量的差别还是质的差异引起的，尚待深入研究。

免疫印迹结果表明，3种类型的病毒感染细胞在24 h均见到明显的多角体蛋白区带，这与对感病培养细胞的观察结果是一致的。B型多角体数最少，可能存在多角体蛋白有部分未被包装。C型多角体蛋白明显少于A型和B型，但多角体数比B型多，推测不同基因结构型间存在着包装效率的差异。免疫印迹结果发现，细胞感染病毒48 h和72 h时A型出现2个区带，而主区带似又有2个重叠带，小带的出现是否与最大带的断裂有关。另一重要发现是，C型多角体蛋白的分子量比A型和B型的小2.5 kb（图4），但分子克隆和序列分析的结果，C型多角体蛋白组成中只有一个氨基酸的改变，即Glu101Gly，这样的变化不足以引起分子量的明显差别，而且尚未有报道表明多角体蛋白存在后加工，这种现象有待深入研究。我们以前的研究表明，与A

```
PHA    GACATGTAATGATTAGATAGTACAAAATATTTAGATTAGATAATATTGACATGTAATTTC    60
PHB    GACATGTAATGATTAGATAGTACAAAATATTTAGATTAGATAATATTGACATGTAATTTC    60
PHC    GACATGTAATGATTAGATAGTACAAAATATTTAGATTAGATAATATTGACATGTAATTTC    60
       ************************************************************
PHA    TCAATACTACAAAGATTTAAGTGATGATAAGGAATTTATTACTATTGTTCTAGATAGTGA    120
PHB    TCAATACTACAAAGATTTAAGTGATGATAAGGAATTTATTACTATTGTTCTAGATAGTGA    120
PHC    TCAATACTACAAAGATTTAAGTGATGATAAGGAATTTATTACTATTGTTCTAGATAGTGA    120
       ************************************************************
PHA    AAAATCAAATATCCCATAATGTATAGTCGTTATAGCGCCTACAATTATAGTCCCCATCTG    180
PHB    AAAATCAAATATCCCATAATGTATAGTCGTTATAGTGCCTACAATTATAGTCCCCATCTG    180
PHC    AAAATCAAATATCCCATAATGTATAGTCGTTATAGTGCCTACAATTATAGTCCCCATCTG    180
       *********************************** ************************
                                          M  Y  S  R  Y  S  A  Y  N  Y  S  P  H  L
PHA    GGCAAAACCTATGTATACGATAACAAGTATTACAAAAATCTAGGTCACGTGATTAAAAAT    240
PHB    GGCAAAACCTATGTATACGATAACAAGTATTACAAAAATCTAGGTCACGTGATTAAAAAT    240
PHC    GGCAAAACCTATGTATACGATAACAAGTATTACAAAAATCTAGGTCACGTGATTAAAAAT    240
       ************************************************************
        G  K  T  Y  V  Y  D  N  K  Y  Y  K  N  L  G  H  V  I  K  N
PHA    GCTAAACGCAAACACGATGCTCTCGAACGCGAGGCCGACGAGCGTGAGCTCGATCACCTC    300
PHB    GCTAAACGCTAACACGATGCTCTCGAACGCGAGGCCGACGAGCGTGAGCTCGATCACCTC    300
PHC    GCTAAACGCAAACACGATGCTCTCGAACGCGAGGCCGACGAGCGTGAGCTCGATCACCTC    300
       *********. **************************************************
        A  K  R  K  H  D  A  L  E  R  E  A  D  E  R  E  L  D  H  L
PHA    GACAAGTATCTGGTCGCAGAGGATCCGTTCATGGGTCCTGGTAAAAATCAAAAGTTGACT    360
PHB    GACAAGTATCTGGTCGCAGAGGATCCGTTCATGGGTCCTGGTAAAAATCAAAAGTTGACT    360
PHC    GACAAGTATCTGGTCGCAGAGGATCCGTTCATGGGTCCTGGTAAAAATCAAAAGTTGACT    360
       ************************************************************
        D  K  Y  L  V  A  E  D  P  F  M  G  P  G  K  N  Q  K  L  T
PHA    CTGTTCAAAGAGATTCGTAACGTGAAGCCCGACACGATGAAGCTGATCGTCAATTGGAAC    420
PHB    CTGTTCAAAGAGATTCGTAACGTGAAGCCCGACACGATGAAGCTGATCGTCAATTGGAAC    420
PHC    CTGTTCAAAGAGATTCGTAACGTGAAGCCCGACACGATGAAGCTGATCGTCAATTGGAAC    420
       ************************************************************
        L  F  K  E  I  R  N  V  K  P  D  T  M  K  L  I  V  N  W  N
PHA    GGTAAAGAGTTTCTGCGCGAGACTTGGACTCGCTTTATGGAAGACAGCTTCCCCATCGTG    480
PHB    GGTAAAGAGTTTCTGCGCGAGACTTGGACTCGCTTTATGGAAGACAGCTTCCCCATCGTG    480
PHC    GGTAAAGAGTTTCTGCGCGGGACTTGGACTCGCTTTATGGAAGACAGCTTCCCCATCGTG    480
       ******************* ****************************************
        G  K  E  F  L  R  E  T  W  T  R  F  M  E  D  S  F  P  I  V
PHA    AACGATCAAGAAGTGATGGACGTGTTTTTAGTGGTAAACATGCGTCCCACTAGACCGAAC    540
PHB    AACGATCAAGAAGTGATGGACGTGTTTTTAGTGGTAAACATGCGTCCCACTAGACCGAAC    540
PHC    AACGATCAAGAAGTGATGGACGTGTTTTTAGTGGTAAACATGCGTCCCACTAGACCGAAC    540
       ************************************************************
        N  D  Q  E  V  M  D  V  F  L  V  V  N  M  R  P  T  R  P  N
PHA    CGTTGCTTTAGATTTTTAGCGCAGCACGCGCTCCGATGCGATCCCGAGTACGTTCCTCAC    600
PHB    CGTTGCTTTAGATTTTTAGCGCAGCACGCGCTCCGATGCGATCCCGAGTACGTTCCTCAC    600
PHC    CGTTGCTTTAGATTTTTAGCGCAGCACGCGCTCCGATGCGATCCCGAGTACGTTCCTCAC    600
       ************************************************************
        R  C  F  R  F  L  A  Q  H  A  L  R  C  D  P  E  Y  V  P  H
PHA    GACGTGATCCGCATCGTCGAACCGTCGTACGTCGGCACCAACAATGAATACCGCATCAGT    660
PHB    GACGTGATCCGTATCGTAGAACCGTCGTACGTCGGCACCAATAACGAATACCGCATCAGT    660
PHC    GACGTGATCCGTATCGTAGAACCGTCGTACGTCGGCACCAATAACGAATACCGCATCAGT    660
       *********** ***** *********************** ** ***************
        D  V  I  R  I  V  E  P  S  Y  V  G  T  N  N  E  Y  R  I  S
PHA    CTCGCCAAGAAAGGTGGCGGTTGTCCCGTGATGAACCTGCACGCCGAATACACCACGTCG    720
PHB    CTGGCTAAGAAGGGCGGCGGTTGTCCCGTGATGAACCTGCACGCCGAATACACCACGTCG    720
PHC    CTGGCTAAGAAGGGCGGCGGTTGTCCCGTGATGAACCTGCACGCCGAATACACCACGTCG    720
       ** ** *****.** *********************************************
        L  A  K  K  G  G  G  C  P  V  M  N  L  H  A  E  Y  T  T  S
PHA    TTCGAGAGCTTCATCGACAAGGTGATATGGTACAACTTTTACAAGCCCATCGTGTACGTG    780
PHB    TTCGAGAGCTTCATCGACAAGGTGATATGGTACAACTTTTACAAGCCCATCGTGTACGTG    780
PHC    TTCGAGAGCTTCATCGACAAGGTGATATGGTACAACTTTTACAAGCCCATCGTGTACGTG    780
       ************************************************************
        F  E  S  F  I  D  K  V  I  W  Y  N  F  Y  K  P  I  V  Y  V
PHA    GGCACCGATTCGGCCGAAGAGGAGGAGATCCTTCTCGAAGTGTCGCTCGTGTTCAAGATC    840
PHB    GGCACCGACTCGGCTGAAGAGGAGGAGATCCTTCTCGAAGTGTCGCTCGTGTTCAAGATC    840
PHC    GGCACCGACTCGGCTGAAGAGCAGGAGATCCTTCTCGAAGTGTCGCTCGTGTTCAAGATC    840
       ******** ***** *********************************************
        G  T  D  S  A  E  E  E  E  I  L  L  E  V  S  L  V  F  K  I
PHA    AAAGAGTTTGCTCCCGACGCGCCTCTATACACGGGTCCCGCGTATTAA                888
PHB    AAAGAGTTTGCTCCCGACGCGCCTCTATACACGGGTCCCGCGTATTAA                888
PHC    AAAGAGTTTGCTCCCGACGCGCCTCTATACACGGGTCCCGCGTATTAA                888
       ************************************************
        K  E  F  A  P  D  A  P  L  Y  T  G  P  A  Y
```

图 5 SpltMNPV A、B 和 C 型多角体蛋白基因(含 5′端)的核苷酸序列及其推定的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide sequence of SpltMNPV A, B, C polyhedrin genes (including 5′ end) and predicted amino acid sequence

黑体字母代表杆状病毒晚晚期基因启动子基序 Black font is the motif of baculovirus promoter of very late gene; E: C 型 101 位是 G (C type 101 site is G).

型和 B 型相比，C 型的 G10-3 能引起斜纹夜蛾幼虫的迅速死亡，对 G10-3 生物学特性和分子生物学的深入研究将有助于开发新的斜纹夜蛾病毒杀虫剂（Kamiya *et al*., 2004）。

核苷酸和氨基酸序列分析表明，与 SpltMNPV 的中国株相比，日本株的 *polh* 基因编码区内，A 型有 12 处发生了碱基突变，B 型和 C 型分别只有 1 处发生了碱基突变(图 5)，但 C 型的碱基突变引起了氨

表 2　SpltMNPV 多角体蛋白基因氨基酸(上三角)和核苷酸(下三角)序列的同源性(%)

Table 2　Amino acid (upper triangle) and nucleotide sequence (lower triangle) identities (%) of SpltMNPV polyhedrin gene

核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid									
	SpltjpA	SpltjpB	SpltjpC	SpltCN	SeMNPV	HcNPV	BmNPV	LdMNPV	AcMNPV	OpMNPV
SpltjpA		100	99.6	100	82.6	83.1	78.1	80.1	83.6	82.6
SpltjpB	98.6		99.6	100	82.6	83.1	78.1	80.1	83.6	82.1
SpltjpC	98.5	99.9		99.6	82.1	82.6	77.6	79.6	83.1	82.1
SpltCN	98.6	100	99.9		82.6	83.1	78.1	80.1	83.6	82.6
SeMNPV	74.1	74.3	74.1	74.3		83.6	80.1	79.1	84	83.1
HcNPV	68.1	69.2	69	69.2	70.8		85	78.6	99.6	88.7
BmNPV	61.2	62.1	61.9	62.1	69.5	74.7		78.1	85.5	91
LdMNPV	69.2	69.4	69.2	69.4	66.6	69.7	68.5		79.1	78.1
AcMNPV	68.3	69.4	69.2	69.4	71	99.9	74.9	69.9		89.2
OpMNPV	69.5	68.9	68.7	68.9	73.1	76	79.6	71.5	76.2	

SpltjpA：日本株 A 型斜纹夜蛾核型多角体病毒 Type A，Japanese strain SpltMNPV；SpltjpB：日本株 B 型斜纹夜蛾核型多角体病毒 Type B，Japanese strain SpltMNPV；SpltjpC：日本株 C 型斜纹夜蛾核型多角体病毒 Type C，Japanese strain SpltMNPV；SpltCN：中国株斜纹夜蛾核型多角体病毒 Chinese strain SpltMNPV；SeMNPV：甜菜夜蛾核型多角体病毒；HcNPV：美国白蛾核型多角体病毒；BmNPV：家蚕核型多角体病毒；LdMNPV：舞毒蛾核型多角体病毒；AcMNPV：苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒；OpMNPV：黄杉毒蛾核型多角体病毒.

基酸的突变。在核型多角体病毒中，*polh* 是保守性很强的基因，本研究结果也证实了这一点。尽管 3 株病毒的 *polh* 基因序列间同源性很高，但 3 株病毒基因组 DNA 的 *Eco*RⅠ酶切图谱以及它们的增殖能力和致病性差异很大，说明这 3 株病毒是生物学特性很不同的病毒。对 SpltMNPV 多种分离株的基因组基因组成和基因结构的比较研究，将为今后研究病毒基因组的变异与生物学特性的关系以及昆虫 NPV 基因组多型发生机制提供重要线索。

与核型多角体蛋白基因编码核苷酸具有较多同源序列不同，SpltMNPV *ph* 基因 5′端启动子调控序列与 AcMNPV 和 BmNPV 存在很大差异。以 5′端(nt -1 – -100)区域相比较，SpltMNPV 与 AcMNPV 和 BmNPV 的同源性只有 23.4% 和 11.0%，而 AcMNPV 和 BmNPV 在此区的同源性为 85.0%。Rankin 等(1988)关于 AcNPV 核型多角体蛋白基因启动子调控序列表达作用的分析认为，该启动子序列有 12 个高度保守核苷酸，特别是其中 TAAGTATT(nt-44 – -51)8 个核苷酸对该启动子的表达功能具有至关重要的影响，SpltMNPV *ph* 基因在这 8 个核苷酸中(TAAGGAAT，nt-44 – -51)有 2 个发生变异。

参 考 文 献(References)

Caballero P，Zuidema D，Santiago-Alvarez C，Vlak JM，1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocont. Sci. Technol.*，2：145 – 157.

Gabriel BP，1997. Insects and Mites Injurious to Philippine Crop Plants. National Crop Protection Center，UPLB，College，Laguna. 1 – 171.

Hara K，Fnakoshi M，Kawarabata T，1995a. *In vivo* and *in vitro* characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Virol.*，39：215 – 222.

Hara K，Fnakoshi M，Kawarabata T，1995b. A cloned cell line of *Spodoptera exigua* has a highly increased susceptibility to the *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Can. J. Microbial.*，41：1 111 – 1 116.

Kamiya K，Zhu J，Murata M，Masanori M，Barbara A，Lavina C，Ikeda M，Kobayashi M，Kawamura S，2004. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm，*Spodoptera litura* (Lepidoptera：Noctuidae) in Japan. *Biological Control*，31：38 – 48.

Lavina BA，Kamiya K，Kawamura S，Ikeda M，Kobayashi M，2001a. Comparative *in vitro* analysis of geographic variants of nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera litura* isolated from China and Philippines. *J. Insect Biotech. Seric. Jpn.*，70 (3)：199 – 209.

Lavina BA，Padua L，Wu F，Shirata N，Ikeda M，Kobayashi M，2001b. Biological characterization of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera litura* (Lepidoptera：Noctuidae) isolation the Philippines. *Biological Control*，20：39 – 47.

Li CB，Li ZF，Yan QS，Hu GD，Pang Y，2001. Cloning and sequencing of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus *gp*37 gene cluster. *Progress in Biochemistry and Biophysics*，28 (5)：677 – 682. [李充璧，李朝飞，闫庆生，胡国栋，庞义，2001. 斜纹夜蛾核多角体病毒 *gp*37 及其邻近序列的克隆及分析. 生物化学与生物物理进展，28 (5)：677 – 682]

Lu HS，1998. Molecular Biology of Insect Viruses. Beijing：China Agricultural Scientech Press. 621 – 641. [吕鸿声，1998. 昆虫病毒分子生物学. 北京：中国农业科技出版社. 621 – 641]

Maeda S，Majima K，1990. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*，

71: 1 851 – 1 855.

Moscardi F, 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 257 – 289.

Murata M, Etoh T, Itoyama K, Tojo S, 1998. Sudden occurrence of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in southern Japan during the typhoon season. *Appl. Entomol. Zool.*, 33: 419 – 427.

Pang Y, Yu J, Wang L, Hu X, Bao W, Li G, Chen C, Han H, Hu S, Yang H, 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*, 287(2): 391 – 404.

Rankin C, Ooi B, Miller L, 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene*, 70: 39 – 49.

Sambrook J, Russell DW, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor-Laboratory Press. 26 – 118, 611 – 627.

Shirata N, Ikeda M, Kamiya K, Kawamura S, Kunimi Y, Kobayashi M, 1999. Replication of nucleopolyhedrovirus of *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae), *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Hyphantria cunea*, and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in four Lepidoptera cell lines. *Appl. Entomol. Zool.*, 34: 507 – 516.

Wei YJ, Long QX, Chen SW, Wang XZ, 1998. Nucleotide sequenced and characterization of the *p*10 gene of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 30(6): 550 – 555.

Wei YJ, Long QX, Chen SW, Wang XZ, 1999. Restriction patterns and nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. *Microbiology*, 26(2): 88 – 92. [魏永杰,龙綮新,陈尚武,王恂章,1999. SlNPV 基因组酶切图谱及多角体基因的序列分析. 微生物学通报, 26(2): 88 – 92]

Wu F, Lavina B, Ikeda M, Shirata N, Cai YX, Pan SX, Kobayashi M, 2000. Cloning and biological characterization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in nucleopolyhedrovirus isolated from China. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 69 (3): 177 – 189.

Yan QS, Pang Y, Nong G, Ouyang XG, Long QX, 1998. Cloning and partial nucleotide sequencing of *egt* gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleaopolyhedrovirus. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 37 (3): 125 – 127. [闫庆生, 庞义, 农广, 欧阳晓光,龙綮新,1998. 斜纹夜蛾核多角体病毒 *egt* 基因的克隆和部分序列分析. 中山大学学报(自然科学版),37 (3): 125 – 127]

(责任编辑: 黄玲巧)